

**Az MsDwf1<sup>-</sup> törpe diploid *Medicago sativa* növények mutációt hordoznak a gibberellin  
3- $\beta$ -hidroxiláz génben**

**Doktori értekezés tézisei**

**Dalmadi Ágnes**

**2009**

**Biológia Doktori Iskola, Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program**

**A Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, D. Sc., professor**

**Programvezető: Dr. Orosz László, D. Sc., professor, MTA levelező tag, egyetemi tanár**

**Témavezetők: Dr. Kiss György Botond, D. Sc., tudományos tanácsadó**

**Dr. Kaló Péter, Ph. D., csoportvezető**

**Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő**

## Bevezetés és célkitűzés

A lucerna (*Medicago sativa*) fajok az egész világon elterjedt gazdaságilag jelentős pillangósvirágú növények. A különböző *Medicago* fajok a molekuláris biológia reflektorfényébe elsősorban a szimbiotikus nitrogénkötő, illetve a mikorrhiza kapcsolatra való képességük miatt kerültek be, de kiterjedt kutatások folynak a kórokozókkal szembeni válaszreakcióik és egyéb biológiai folyamatok molekuláris hátterének felderítése érdekében is. A lucernán zajló kutatásokat nagymértékben elősegíti a *Medicago* Genom program (<http://www.medicago.org>), melyet a pillangós modellnövény *Medicago truncatula*-n folytatnak. Egyéb pillangós fajokkal, mint a tetraploid és diploid lucernákkal vagy a borsóval korábban kimutatott genomszintű és szekvencia szintű hasonlósága révén ez a növény jó eszköze a mutáns fenotípusokért felelős gének felderítésének. A kizárólag *M. truncatula*-n végzett kutatás eredményeinek közvetlen felhasználását a termesztett lucernára azonban megnehezíti, hogy a két faj egymással nem keresztezhető.

A diploid *M. sativa* alfajok a *M. truncatula*-nál szorosabb rokonságban állnak a tetraploid termesztett lucerna fajtákkal. Mivel ezek a növények idegentermékenyülők, a természetben előforduló növények genomjának nagy része heterozigóta állapotban van. Ilyen módon fennmaradhatnak a populációban különböző mutáns allélok. A heterozigóta növényeknek önbeporzását követően gyakran jelennek meg mutáns fenotípusok, ha egy a természetben előforduló allélváltozat homozigóta állapotba kerül. Ezt a jelenséget Kiss és munkatársai (1993) kihasználták a diploid *M. sativa* géntérképének létrehozásakor. A dolgozatomban leírt munka az itt használt populációban felbukkant törpe fenotípusért felelős gén izolálását célozza.

Célravezető lehet, ha a fenotípusért felelős gén izolálásának kérdését több irányból közelítjük meg, egyrészt használjuk a térképalapú klónozás módszerét, másrészt a mutáns növény jellemzőiből következtetve keresünk jelölt gént. Mi ezen a két útvonalon indultunk el.

A feladat elvégzéséhez a munkacsoportban rendelkezésünkre állt a diploid *M. sativa* részletes géntérképe és a térkép elkészítéséhez használt alap térképező populáció, illetve a „genomsétához” a *M. truncatula* BAC könyvtár. A jelölt gén megközelítéshez megvizsgáltunk más növényfajok olyan már ismert génjeit, melyek mutációja hasonló fenotípust eredményez. Végül a borsó egy mutánsából kiindulva találtunk megfelelő jelölt gént. További kísérleteink arra irányultak, hogy bebizonyítsuk, hogy a jelölt gén valóban azonos a keresett, a diploid lucernában törpe fenotípust okozó génnel.

## Anyagok és módszerek

### A növényi anyag nevelése

Az F2 térképező populáció két diploid lucerna alfaj, a *M. sativa ssp. quasifalcata* (Mqk93) és a *M. sativa ssp. coerulea* (Mcw2) keresztezéséből származik (Kiss és mtsai., 1993). A növényeket cserepekben, üvegházi körülmények között tartottuk fenn. A kiterjesztett populáció tagjait SANYO MLR-350 klímakamrában hosszúnappalos körülmények között neveltük az első tesztelés befejezéséig. Az apai allélek meghatározásához a Mcw2 pollenadó növény önbeporzásából nyert utódpopuláció növényeit használtuk. A transzformáláshoz használt *ga4* mutáns *Arabidopsis* növények magjait a Nottingham Arabidopsis Stock Centre magbankból rendeltük. A T1 magokat steril körülmények között vetettük ki 15 µg/ml kanamicint tartalmazó feles MS táptalajra (Duchefa). A T2 növényeket hosszúnappalos körülmények mellett MLR-350 Sanyo klímakamrákban neveltük 5 cm átmérőjű műanyag poharakban.

### Növényi tesztek

Az exogén gibberellin kezelést az F2 térképező populáció két-két törpe, ill. vad növekedési fenotípusú tagjának vegetatív szaporításaiból létrehozott növényeken végeztük. A bioaktív GA<sub>3</sub>-t (Sigma, St Louis, MO, USA) etanolban oldottuk, majd vízzel hígítottuk tovább. A 70 és 140 µM-os oldatból két héten át hetente kétszer juttattunk ki 100-100 ml-t a kezelt növények talajára a 15 cm átmérőjű cserepekben. Az utolsó kezelés után három héttel mértük a növények összes hajtásának hajtáscsúctól számított harmadik internódiumának hosszát. Az ékoltást a már korábban leírt (Krusell és mtsai., 2002) módon végeztük. Az oltványok növekedését 6 hónapig követtük nyomon.

### DNS technikák

Az amplifikációs reakciókhoz használt genomi DNS kivonását ZenoGene DNS izoláló Kit-tel, a hibridizációs kísérletekhez a kissé módosított CTAB módszerrel (Doyle és Doyle 1987) végeztük. A PCR (polimeráz láncreakció) kísérleteket általánosan a Sambrook és Russel (2001) által leírtak alapján készült töménységű pufferrel állítottuk össze, a MgCl<sub>2</sub> végkoncentrációja 1,5 mM-os volt. A reakciókat ABI GeneAmp PCR Systems 2700 és MJ Research PTC-200 berendezéssel végeztük. A kísérletek körülményeit minden primerpárnál optimalizáltuk. Az újabb primerpárokat Primer Premier és Primer Select nevű programokkal terveztük. A genetikai térképezést színtérképezés módszerével végeztük (Kiss és mtsai., 1998). A hosszpolimorfizmust nem mutató fragmentek esetében SSCP (egyszálú DNS konformáció-különbségek) eljárással kerestünk különbségeket (Orita és mtsai., 1989). A mintákhoz 1:1 arányban adtunk STOP festéket és 98 °C-on 5 percig denaturáltuk. Az analízis

során az elválasztás natív poliakrilamid gélen történt. Az SSCP mellett egy *Ce/I* emésztésen alapuló heteroduplex analízist használtunk még a fragmentek közötti különbségek kimutatására (Oleykowski és mtsai., 1998). Ehhez a reakcióhoz előzetesen a kapott amplifikátumokból heteroduplexet képeztünk, majd nukleáz hasítást követően a fragmenteket denaturáló akrilamidon választottuk el. A különböző DNS fragmenteket mindkét esetben ezüst-nitrát festéssel tettük láthatóvá. A hibridizációs kísérleteket a Sambrook és Russel (2001) által leírt módon végeztük. A fragmentet [ $\alpha$ -32P]dCTP beépítésével radioaktívan jelöltük (Amersham Biosciences, Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)). A hibridizációs kép létrehozásához Amersham Biosciences tároló Phosphor Screen-t és STORM 840 (Molecular Dynamics) szkennert használtunk.

### **A BAC klónok kezelése, kontigépítés**

A *Dwf1* kontig építéséhez a *M. truncatula* második BAC könyvtárát használtuk. A kontigot alkotó átfedő BAC klónok kiválasztását elsődlegesen bioinformatikai eszközökkel és multiplex PCR technikával végeztük. A kontigépítéshez felhasználtuk a klónok *HindIII* emésztésen alapulóan összeállított kontigjait is, melyek szintén elérhetőek a [www.medicago.org](http://www.medicago.org) internetes adatbázison. A kísérletekhez kiválasztott BAC klónokból a plazmid DNS-t a Sambrook és Russel (2001) által leírtak alapján egy kissé módosított eljárással izoláltuk.

### **Allélszekvenálás, a PCR fragmentek klónozása**

A *GA3ox* gén szülői alléljait (Mqk93 és Mcw2) az F2 populáció homozigótáiból és a w2 növény önbeporzásából származó homozigóta növényekből amplifikáltuk *M. truncatula* szekvencia alapú primerekkel. A PCR terméket GFX oszloppal (Amersham Biosciences) tisztítottuk, majd pGEM-T EASY (Promega) vektorba ligáltuk. A ligátumokkal *Escherichia coli* XL1Blue baktérium törzs kompetens sejtjeit transzformáltunk. A transzformáns telepekből a Maniatis és mtsai. (1982) által leírt módon izoláltuk a plazmid DNS-t.

### **Növényi transzformáció**

A konstrukciók létrehozása elsődlegesen *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , illetve S17 törzs közvetítésével történt *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzsbe. A 7K2 BAC klón megfelelő fragmentjét pCambia2201 vektorba ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) ligáltuk, mely kanamicin rezisztenciát biztosító nptII növényi szelekciós markert tartalmaz. Az MsLehi konstrukciót az MtLe plazmidból hoztuk létre. A plazmidban a struktúrgén nagy része az MsDwf1<sup>-</sup> növényből származik. Az *Agrobacterium* transzformáció *Arabidopsis*-ba a Clough és Bent (1998) által leírt „floral dip” módszerrel történt.

## RNS technikák

Az RNS kivonást az *Arabidopsis* növények hajtásaiból a Szittyá és mtsai. (2002) által leírt módszer alapján végeztük. Az RNS koncentrációt NanoDrop berendezésen mértük meg. Az RNS mintákból a cDNS szintézist a Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit-jével végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően 10 µl-ben.

## Tézisek

1. A mutáns növények kizárólag hajtásrendszerükben térnek el a vad típustól, ezt leszámítva más nyilvánvaló morfológiai különbséget nem tapasztaltunk a vad típushoz képest. Mindez az irodalomban „semidwarf”-nak definiált fenotípusokra jellemző. Az apanövény (Mcw2) önbeporzott populációjának vizsgálatából kiderült, hogy a mutáns allél apai eredetű volt. Az MsDwf1<sup>-</sup> fenotípus a GA<sub>3</sub> kezelés hatására revertálódott. A vad típusú alanyra oltással a fenotípust nem lehetett komplementálni.

2. A finomtérképezéshez több lépcsőben kiterjesztettük a populációt. 317 egyed vizsgálata során azonosítottunk az L295, valamint az OPG4AB határmarkereket. A továbbiakban a két marker között rekombinációt mutató növényeket választottunk ki és ezekkel dolgoztunk. Az 1031 egyed vizsgálatát követően sikerült egy (U189) az L295-nél szorosabban kapcsolt markert azonosítanunk (~0,1 cM MsDwf1-től). CycMs3 nem mutatott rekombinációt MsDwf1 lókusszal az 1031 egyedes populációban.

3. Az MsDwf1 lókuszhoz szorosan kapcsolt markerek birtokában fizikai genomátát folytattunk a *M. truncatula* második BAC könyvtár (mth2) klónjaival. Átfedő klónokból a két legközelebbi határmarker közötti kromoszóma részletet lefedő kontigot építettünk. A genomátát a legszorosabban kapcsolt CycMs3 és U189 markerektől indítottuk el. A BAC szekvenciákra tervezett primereket felhasználtuk a BAC klónok genetikai visszatérképezéséhez. Így az MsDwf1 gént tartalmazó genetikai régiót leszűkítettük az U189 (~0,1 cM MsDwf1-től) és a 22D10\_1 (~0,2 cM MsDwf1-től) markerek közötti szakaszra.

4. A fenotípus jellemzőiből kiindulva jelölt gént kerestünk. Annak tisztázására, hogy az MsDwf1<sup>-</sup> növények esetében a gibberellin 3-β-hidroxiláz enzimet kódoló gén (*GA3ox*) mutációjáról van-e szó, megkerestük a gén *Medicago* ortológjait. BLASTn kereséssel azonosítottuk a *M. truncatula* TC adatbázisból a borsó *Le* génjével nagy hasonlóságot mutató

TC97820-t, ill. a *M. truncatula* BAC szekvencia adatbázisból a megfelelő genomi régiót tartalmazó mth2-7K2 (AC144340) BAC klónt. A génre intront közrefogó primerpárt terveztünk, mely segítségével a *M. sativa* populáción térképeztük az amplifikált DNS szakaszt. A kapott molekuláris marker (MsLe) tökéletesen koszegregált a törpeség lókuszával, az mth2-7K2 BAC klón pedig beilleszthető az épített *M. truncatula* BAC kontigba.

5. Feltételeztük, hogy az MsDwfl<sup>-</sup> növényekben a *GA3ox* gén olyan mutációt hordoz, ami az enzim működőképességét károsan befolyásolhatja. A hipotézis igazolására a *M. truncatula* gén szekvenciája alapján tervezett primerek segítségével amplifikáltuk, klónoztuk és megszekvenáltuk a heterozigóta apanövény (Mcw2) vad típusú *MsDwfl* és mutáns *msdwfl* allélját és a populációban előforduló anyai (Mqk93) allélt. Az Mcw2 növény két alléljának fehérje szekvenciája csak a Gly126Asp pontban tér el egymástól. A 126. pozícióban az Mqk93 allél a vad típusú Mcw2 allélhoz hasonlóan glicint tartalmaz.

6. Filogenetikai analízis végeztünk különböző fajokból származó fehérjeszekvenciákkal annak érdekében, hogy a bizonyos fajokban kisebb géncsaládokat alkotó *GA3ox* gének között el tudjuk helyezni a *M. sativa* fehérjét kódoló gént. Az izolált *M. sativa* gén aminosav szinten az *Mtle* fehérjén kívül (97% egyezés) a legnagyobb hasonlóságot az evolúciós közelségüknek megfelelően a borsó *Le* (gibberellin 3- $\beta$ -hidroxiláz) fehérjével mutatja (89%).

7. A *GA3ox* gén kópiaszámának meghatározása érdekében DNS-DNS hibridizációs kísérletet végeztünk. A kísérletben egyetlen erős jelet kaptunk a *M. truncatula* A17 sávjában. A két szülő keresztezéséből származó utód növényeknél a *DraI* és az *EcoRI* esetében RFLP polimorfizmust kaptunk, mely koszegregált a törpe fenotípussal. A PCR-rel végzett kísérletekben szintén csak egy kópiát tudtunk kimutatni a génből a vizsgált két *Medicago* faj esetében. Végeztünk blast alapú homológia kereséseket a rendelkezésünkre álló *M. truncatula* genomi szekvencián az *Arabidopsis thaliana* *GA3ox* génekkel, de nem sikerült egyértelmű jelölt géneket találnunk a feltételezett egyéb GA3ox aktivitású fehérjék génjeire.

8. *Arabidopsis* heterológ transzformációs kísérletben összehasonlítottuk a vad fenotípusú *Medicago truncatula* *GA3ox* génjét (MtLe) tartalmazó és egy olyan konstrukciót (MsLehi), amiben a struktúrgén döntő részét kicseréltük az MsDwfl<sup>-</sup> növényből származó (Mcw2 mutáns) alléllal. Mindkét konstrukciót az *Arabidopsis ga4* mutáns növényekbe transzformáltuk *Agrobacterium tumefaciens* rendszer segítségével. Az MtLe konstrukcióval

transzformált növények a vad típusú Landsberg erecta növényekhez hasonló méretűek voltak. Ezzel ellentétben nem tapasztaltuk az MsLehi konstrukcióval transzformált növények magasságának szignifikáns eltérését a törpe mutáns *ga4* növényektől. A transzgenikus növényekből reverz transzkripció kísérlettel kimutattuk a transzgenről képződött mRNS-t.

## Következtetések

A kísérletekben az MsDwf1<sup>-</sup> növények „semidwarf” fenotípusa exogén GA<sub>3</sub> hatására reverteződött. Ez arra utal, hogy a GA bioszintézisben résztvevő egyik enzim génjének mutációja miatt lecsökkent a bioaktív GA mennyisége a hajtásban, és ez okozta a törpességet. Az oltási kísérleteinket követően azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a GA bioszintézis bioaktív végterméke nem transzportálódott, és a mobilis prekursor vegyületek nem tudtak bioaktív GA-vá alakulni az oltott mutáns hajtásban. Tehát a borsó *le* mutánsával végzett kísérlethez hasonló eredményt kaptunk, így valószínűsítettük, hogy a bioaktív GA<sub>1</sub> képződésének terminális lépése érintett a vizsgált törpe mutánsban.

A borsó *le* mutánsában a gibberellin 3- $\beta$ -hidroxiláz (*GA3ox*) génnek a mutációja okozta a Mendel által leírt törpe növekedési fenotípust. A fenotípust korábban kis egyedszámú populációval már többen térképezték, és a borsó kapcsoltsági térképen LG III-ra helyezték (Rameau mtsai., 1998; Weeden mtsai., 1998; Ellis és Poyser, 2002). Mi az *MsDwf1* gént egy nagy egyedszámú populáción térképeztük és azonosítottunk egy lókuszt. Igazoltuk, hogy az MsLe markerrel megjelölt gén genetikai és fizikai értelemben is a fenotípust kialakító *MsDwf1* lókuszbba esik. Mivel az MsDwf1 genomi régió a borsó *GA3ox (Le)* génjét tartalmazó régióval szintenikus (Kaló mtsai., 2004), és a *M. truncatula* és a borsó gén szekvenciája nukleotid szinten is nagymértékben hasonló, a továbbiakban a *Medicago* fajoknak ezt a génjét a borsó *Le* gén ortológjának tekintettük.

Megszekvenáltuk az Mqk93 és Mcw2 (*MsDwf1* és *msdwf1*) allélokot. Az *msdwf1* allél esetében talált Gly126Asp csere invariáns aminosav cseréjének számít más típusú aminosavra. Ez és az, hogy a GYG motívum az enzimesalád egyéb tagjaiban is konzervált, arra utal, hogy a Gly126 aminosav valamilyen fontos szerepet tölthet be az enzimből, cseréje nagy mértékben csökkentheti vagy megszüntetheti az enzim funkcióképességét. Figyelembe véve mindezt, és hogy ez az egyetlen különbség a Mcw2 növény két allélja között, úgy gondoljuk, hogy ez a mutáció felelős az MsDwf1<sup>-</sup> fenotípusért. Az Mqk93 és Mcw2 allélok közötti egyéb különbségek valószínűleg nem befolyásolják döntően a fehérje működőképességét, allélikus eltéréseknek tekinthetők. A Gly126Asp csere a 2-oxoglutarav

(2OG) és Fe(II)-függő oxigenáz enzimsaládra jellemző ismert motívumoktól a szekvenciában viszonylag messze történt. A Gly126 konzervált több növényfaj és az enzimsalád egyéb tagjai között is, ám a pontos funkciója jelenleg még nem tisztázott. Így ezek a törpe mutáns növények és az izolált mutáns *GA3ox* allél lehetőséget nyújthatnak az enzim működésének megismerését célzó további kutatásoknak.

A PCR és a hibridizációs kísérletek alapján kijelenthetjük, hogy a *GA3ox* génből csak egy kópiát tudunk kimutatni *M. truncatula*-ból. Azt azonban nem zárhatjuk ki, hogy ettől a géntől nukleotid szinten eltérő, de hasonló enzim aktivitású génterméket kódoló *GA3ox* gén(ek) létezhetnek még a *Medicago* fajok genomjában. Sőt ezt a feltételezést támasztja alá a fenotípus „semidwarf” jellege is. A géncsalád tagjai különböző funkciójuk mellett kis mértékben egymás feladatát is elláthatják, amit az *Arabidopsis* esetében már kimutattak (Mitchum mtsai., 2006). Bioinformatikai eszközökkel nem sikerült az *Arabidopsis* egyéb *GA3ox* génjeinek ortológ jelöltjeit megtalálni a *M. truncatula*-ban. Ez azonban nem jelenti azt, hogy nem léteznek ilyen gének, mivel nem teljes még a *M. truncatula* genomi szekvenciája, illetve nem biztos, hogy az *Arabidopsis*-szal olyan szintű az illető gének hasonlósága, hogy egyértelműen kijelölhetőek lennének.

Az *Arabidopsis ga4* mutánsán végzett transzformációs kísérlet eredményei szintén alátámasztják azt a feltevésünket, hogy a vizsgált *GA3ox* gén az *MsDwf1<sup>-</sup>* mutáns növényekből származó allélje olyan mutációt hordoz, ami felelős lehet a törpe fenotípusért.

A jelen dolgozatban egy *GA3ox* gén mutációt vizsgáltunk. A *Medicago* fajok esetében ennek a génnek még nem írták le mutáns változatát és annak fenotípusát. A Noble Foundation keretében készített több mint 17 000 transzpozíciós vonal eddig elkészült határszekvenciáiról (Flanking Sequence Tag-FST) közzétett adatbázisban sem szerepel a gén. Tehát a *Medicago* fajok *GA3ox* fehérjéjének vizsgálatához az *MsDwf1<sup>-</sup>* növények alapvető jelentőségűek lehetnek.

A korábbi térkép-összehasonlítási eredményeknek megfelelően mi is nagyfokú hasonlóságot tapasztaltunk a vizsgált régióban a *M. truncatula* és a *M. sativa* genom között. Kísérleteink alátámasztják a korábbiakban leírt kísérleti eredményeket a *Medicago* fajok és a borsó összehasonlító térképezés terén is.

A jelen dolgozatban ismertetett munka jó példát jelent arra, hogy hogyan integrálhatóak a *M. truncatula* genom projekt és a borsón végzett genetikai kutatások eredményei egy *M. sativa*-n folyó térképalapú klónozási munkával. Az *MsDwf1* gén azonosítása mellett szintén eredménynek tekinthetjük, hogy létrehoztunk egy olyan genomi klónokból álló kontigot, ami a későbbiekben megkönnyítheti a *M. truncatula* kettes kromoszóma e régiójának tervszerű,



lehető leggazdaságosabb szekvenálását. A régió teljes szekvenciájának ismeretében lehetőség nyílik akár más ide térképeződő, agrónómiailag vagy egyéb szempontból fontos fenotípust kialakító gén izolálására is.

## Irodalomjegyzék

- Choi H-K., Kim DJ., Uhm T., Limpens E., Baek J-M. Lim H., Kalo P., Penmetsa RV., Seres A., Kulikova O., Bisseling T., Kiss GB., Cook DR. (2004) A Sequence-based Genetic Map of *Medicago truncatula* and comparison of marker co-linearity with *Medicago sativa*. Genetics 166: 1463-1502.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J.:16(6):735-43..
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**:11-15.
- Kaló P., Seres A., Taylor S. A., Jakab J., Kevei Z., Kereszt A., Endre G., Ellis T. H. N., Kiss G. B. (2004) Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum* Mol. Gen. Gen. 272: 235–246
- Kiss GB, Csanadi G, Kalman K, Kalo P, Okresz L. (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers, Mol Gen Genet. 238:129-37.
- Kiss G. B., Kereszt A., Kiss P., Endre G. (1998) Colormapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping. Acta Biol. Hun. 49: 125-142
- Krusell L., Madsen L. H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Kaneko T., Tabata S., Bruijn F., Pajuelo E., Sandal N., Stougaard J. (2002) Shoot control of the root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. Nature 420(6914):422-6
- Mitchum M. G., Yamaguchi S., Hanada A., Kuwahara A., Yoshioka Y., Kato T., Tabata S., Kamiya Y., Sun T. (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. The Plant Journal 45, 804–818
- Oleykowski C. A., Mullins C. R. B., Godwin A. K., Xeung A. T. (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease Nucleic Acids Research 20: 4597-4602
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766-2770.
- Sambrook és Russel (2001)

- Sambrook J, Russel D. W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Szittya Gy., Molnár A., Silhavy D., Hornyik Cs., Burgián J. (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14(2):359-372.
- Weeden N. F., Ellis T. H. N., Timmerman-Vaughan G. M., Swiecicki W. K., Rozov S. M., Berdnikov V. A. (1998) A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum genetics* 30:1-3

## **Publikációs lista**

### **Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok:**

- Ágnes Dalmadi, Péter Kaló, Júlia Jakab, Anikó Saskói, Tünde Petrovics, Gábor Deák, Attila Kereszt, György Botond Kiss „Dwarf plants of diploid *Medicago sativa* carry a mutation in the gibberellin 3- $\beta$ -hydroxylase gene.” *Plant Cell Reports* (2008) 27: 1271-1279.
- Márta Balogh, Krisztina Miró, Ágnes Dalmadi, Gábor Deák, Tünde Petrovics, Brigitta Dudás, Péter Kiss, Júlia Jakab, György Botond Kiss “Towards the map based cloning of a recessive *Fusarium* resistance determinant from diploid *Medicago sativa*.” *Acta Phytopathologica et entomologica Hungarica* (2007) 42(2): 279-289.
- István Papp, Luis A. Mur, Ágnes Dalmadi, Sándor Dulai, Csaba Koncz „A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*.” *Plant Mol. Biol.* (2004) 55(5):679-86.

### **Nem publikált tudományos jelentések**

- V. alfeladat részjelentése (2003.01.31-2004.01.31.) A szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő inó és a lisztharman rezisztenciáért felelős *pmr1* lucerna gének izolálása

### **Tudományos intézetekben tartott szakmai előadások: (intézmény, hely, időpont)**

- MBK, Gödöllő, MBK napok 2003. 12. 08-09. A diploid lucerna törpeségéért felelős dwarf gén izolálásában elért eredmények
- MBK, Gödöllő, MBK napok 2004. 11. 25-26. A törpe lucerna *dwrfl* génjének azonosítása
- SZBK, Szeged, Genetikai Műhelyek Magyarországon minikonferencia 2004. 09. 03. A diploid lucerna törpeségéért felelős gén izolálásában elért eredmények